

РЕСВЕРАТРОЛ: ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ

Генералов И.И., Железняк Н.В., Моисеев Д.М., Юпатов Г.И.,
Генералова А.Г., Моисеева А.М.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»

Введение. Ресвератрол (*trans*-3,4',5-тригидроксистильбен) относится к группе растительных полифенолов. Первоначально было показано, что данное соединение является фитоалексином – растительным гормоном с эстрогеноподобным действием. Препарат, содержащий ресвератрол, был впервые получен в 40-х годах XX века в Японии с указанием на возможность его широкого медицинского применения. Максимальное количество ресвератрола обнаружено в корнях растения *Polygonum cuspidatum* (средство традиционной японской медицины Ко-дзе-кон, [2]). Повышенное содержание ресвератрола отмечается в коже и косточках красных сортов винограда (сортов Мускатель, Пино-Фран, Каберне, Мерло и многих других). Дальнейшие исследования подтвердили, что ресвератрол входит в состав биомассы многих растений, включая сою и различные ягоды, содержащие растительные пигменты и комплекс антиоксидантов (шелковица, черника, голубика, клюква, земляника и др.) Возможно, именно наличием ресвератрола хотя бы частично объясняется так называемый «французский парадокс»: употребление в больших количествах красного вина жителями Франции и других средиземноморских государств делает их менее чувствительными к негативным последствиям высококалорийной диеты с повышенным содержанием жиров [2].

В результате многочисленных исследований, проведенных в последние годы, обнаружено, что ресвератрол обладает широчайшим спектром биологической активности. В частности, препарат обладает выраженными противовоспалительными свойствами. Данный эффект обусловлен в первую очередь подавлением синтеза провоспалительных цитокинов, регулируемых через фактор транскрипции NF- κ B. Ресвератрол ингибирует синтез эйкозаноидов, подавляет ЦОГ-2 и в определенных условиях ЦОГ-1. Угнетает перекисное окисление липидов, подавляет агрегацию тромбоцитов. Описано противовирусное, противогрибковое и антибактериальное действие ресвератрола. Препарат активирует апоптоз раковых клеток и подавляет его в кардиомиоцитах при ишемии. Проводятся клинические испытания по применению ресвератрола в профилактике рака предстательной железы, желудка, меланомы, щитовидной железы, колоректального рака [1], ишемической болезни сердца.

В целом наблюдается взрывной рост количества публикаций по всем этим направлениям. Если до середины 90-х годов по ресвератролу имелись лишь отдельные сообщения, то за последние 10 лет опубликовано более 3,5 тысяч работ многочисленными исследовательскими группами из США, Японии, стран ЕЭС, Китая, Индии. Однако работ из стран СНГ по данной проблеме в доступной литературе практически нет.

Все эффекты ресвератрола, безусловно, заслуживают самого внимательного исследования. Очевидный интерес для изучения представляет его иммуномодулирующее действие. С другой стороны, анализ биологической и медицинской активности ресвератрола требует разработки точных методов его детекции и количественного определения.

Цель исследования. Целью исследования стала разработка методики экстракции и количественного анализа ресвератрола при помощи ВЭЖХ в препаратах различного происхождения, включая растительное сырье, а также оценка иммуномодулирующей активности ресвератрола в реакции бласт-трансформации лимфоцитов (РБТЛ).

Материалы и методы. В качестве сырья для экстракции ресвератрола использованы следующие материалы: (1) коммерческая биодобавка (БАД 1) из корней *Polygonum cuspidatum*; (2) коммерческая биодобавка из измельченной кожуры, косточек красного винограда и корней *Polygonum cuspidatum* (БАД 2); (3) различные сорта красного винограда (высушенная измельченная кожура). Кроме того, содержание ресвератрола оценивалось в вине из разных сортов красного винограда (Пино Фран, Каберне Совиньон).

Экстракцию проводили 20% раствором этанола при 60°C в течение 30 минут по методу A.I.Romero-Perez с соавт. (2001 г.) Образцы центрифугировали при 6000 об/мин в течение 10 минут. Некоторые пробы дополнительно фильтровали через стеклянный и далее через нитроцеллюлозный фильтр 0,45 мкм. Ресвератрол в экстрактах определяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на C18-колонке с диодно-матричным детектором. В качестве стандарта использовали ресвератрол пр-ва Sigma, США. Предварительные эксперименты по оценке максимума спектра поглощения стандарта ресвератрола установили, что он равен 307 нм. Объем вносимой пробы – 10 мкл. Элюент – ацетонитрил.

Иммуномодулирующая активность ресвератрола оценивалась с помощью реакции бласт-трансформации лимфоцитов. В культуры мононуклеарных клеток крови вносили полученный нами экстракт, содержащий ресвератрол. Часть культур дополнительно стимулировали препаратом интерлейкина 2 ронколейкином.

Результаты и обсуждение. Содержание ресвератрола в образцах после экстрагирования составило: БАД 1 – 10,3 мг/г сухой массы; БАД 2 – 97 мг/г, в высушенной коже винограда – 0,04-0,05 мг/г сухого измельченного сырья. Следует отметить, что полученные результаты подтвердили эффективность метода экстракции, поскольку в препарате, полученном после выделения из БАД 2, содержание ресвератрола по массе превышало 90%. Количество ресвератрола в красном виноградном вине различного происхождения было на порядок меньше – от 0,5 до 2 мг/мл независимо от сорта винограда.

По результатам РБТЛ спонтанный уровень бласт-трансформации не превышал 5-6%. Фракция мононуклеарных клеток, пролиферирующих под

влиянием интерлейкина 2, увеличилась до 10% и более. В свою очередь, ресвератрол вызывал значительное угнетение пролиферативного ответа на ронколейкин (до 2-3%). Таким образом, ресвератрол подавляет реакцию бласт-трансформации лимфоцитов, в том числе и индуцированную ИЛ-2.

Проведенные нами исследования являются предварительными. В дальнейшем предполагается работа по трем основным направлениям: анализ содержания и выделение ресвератрола из природного сырья отечественного происхождения; оценка биологической и медицинской активности полученных препаратов; получение ресвератрола путем химического синтеза и его модификация для усиления фармакологической активности

Выводы.

1. Разработана методика экстракции и количественного ВЭЖХ-определения ресвератрола в биологических материалах различного происхождения.

2. Ресвератрол в условиях *in vitro* ингибирует ИЛ-2-зависимую пролиферацию мононуклеарных клеток крови человека.

Литература:

1. Boocock D. J., Faust G.E.S., Patel K.R. et al. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2007. – Vol.16, N6. – P.1246-1252.
2. Das D.K., Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine // *Mol. Intervent.* – 2006. – Vol.6, N1. – P.36-47.